

(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 102 01 858 A 1

(21) Aktenzeichen: 102 01 858.8
(22) Anmeldetag: 18. 1. 2002
(43) Offenlegungstag: 14. 8. 2003

(51) Int. Cl. 7:
C 07 H 21/00
C 07 H 1/08
C 12 Q 1/68

(71) Anmelder:

Dr. Tittgen Biotechnologie, 32257 Bünde, DE

(74) Vertreter:

v. Bezold & Sozien, 80799 München

(72) Erfinder:

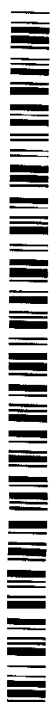
Tittgen, Jochen, Dr., 32257 Bünde, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
Rechercheantrag gem. Paragraph 43 Abs. 1 Satz PatG ist gestellt

(59) Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

(57) Es wird ein Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren von anderen Zellbestandteilen beschrieben, bei dem das Lysat in einer Trennvorrichtung durch ein Filtermaterial filtriert wird, das die Innenfläche der Trennvorrichtung zumindest fast vollständig bedeckt.

DE 102 01 858 A 1



DE 102 01 858 A 1

Beschreibung

[00001] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren von anderen Zellbestandteilen gemäß Oberbegriff von Patentanspruch 1. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Trennvorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

[00002] Die Isolation von Nukleinsäuren aus biologischen Zellen erfolgt durch Lyse der Zellwände. Ein Beispiel ist die alkalische Lyse von Bakterienzellen zur Isolation von Plasmid-DNA. Hierbei werden die Zellen nach der Anzucht in einem geeigneten Nährmedium üblicherweise durch kurze Zentrifugation vom umgebenden Medium abgetrennt, wonach das Zellpellet in einem Pufferpuffer vollständig resuspendiert wird. Dieser Puffer enthält neben einer im pH-Bereich von 7,0 bis 8,0 abpuffernden Substanz (z. B. Tris) oftmals EDTA, um zelluläre DNAsen zu inhibieren sowie Ribonuklease, um in den nachfolgenden Schritten einen gleichzeitigen Abbau der zellulären RNA's zu erreichen.

[00031] Als nächstes werden die suspendierten Zellen durch Zugabe einer Lösung, die NaOH und das Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) enthält, lysiert, wobei die intrazellulären Komponenten freigesetzt werden. Die alkalischen Bedingungen zusammen mit SDS bewirken eine weitgehende Denaturierung der Zellkomponenten.

[00041] Als weiterer Schritt wird der pH-Wert durch Zugabe eines Hochsalz-Acetatpuffers (z. B. Kaliumacetat) in den sauren Bereich (ca. pH 5,0) gebracht. Durch diese schnelle pH-Verschiebung, verbunden mit der Zugabe hoher Salzmengen bei gleichzeitiger Fällung von SDS durch Zugabe von Kaliumionen, wird ein Großteil der bakteriellen Zellkomponenten, der Proteine und der genomischen DNA ausgefällt, die als flockenartiger Niederschlag im neutralisierten Lysat vorliegen.

[00051] Die Plasmid-DNA wird bei dieser Vorgehensweise nicht gefällt, sondern sie verbleibt im Überstand. Für eine effiziente Präparation der Plasmid-DNA ist es daher notwendig, die flüssigen von den gefällten festen Bestandteilen des Lysats zu trennen. In der Praxis sind verschiedene Verfahren bekannt, die im großen Ausmaß in den Laboratorien durchgeführt werden.

1. Trennung der Lysatkomponenten durch Zentrifugation

[00061] Es werden die Lysatkomponenten nach Zugabe des Neutralisationspuffers durch eine hochtourige Zentrifugation in einem Zeitraum von 10 bis 45 Minuten getrennt. Die festen Bestandteile sammeln sich zum größten Teil am Boden des Zentrifugationsgefäßes, während flüssige Überstand (cleared lysate) klar ist. Der flüssige Überstand wird abpipettiert und weiterverarbeitet.

[00071] Die Zentrifugationsabtrennung ist je nach Protokollversion zum Teil sehr zeintensiv. Außerdem ist das Pellet normalerweise nicht homogen. Es kommt oftmals dazu, dass bestimmte Teile nicht pelletieren, sondern auf dem flüssigen Überstand schwimmen. Die Gefahr, Teile des Pellets mit herauszunehmen, ist nicht unerheblich. Je nach Präparationsmethode kann dieser Cotransfer von partikulärem Material eine hemmende Wirkung bei nachfolgenden Applikationen verursachen.

2. Trennung durch Filtration durch einen Patenfilter

[00081] Hierbei werden die Lysatkomponenten durch Filtration getrennt. Die verwendeten Filter, wie Faltenfilter oder Rundfilter, werden in einem vom Anwender zu stellenden Trichter angeordnet, der dann auf beispielsweise eine Chromatographiesäule gesetzt wird. Die festen Bestandteile

werden durch den Filter zurückgehalten, während das flüssige Lysat den Filter passiert und in die Chromatographiesäule einläuft.

[00091] Dieses Trennungsverfahren hat den Vorteil, dass keine Zentrifuge notwendig ist. Allerdings ist es in den meisten Fällen unvernünftig, dass je nach verwendetem Filtertyp die Flüssigkeit nur langsam durchläuft oder sogar der Filter verstopft wird. Das führt zu Zeitverlusten. Der vom Anwender zu stellende Trichter kann des Weiteren kontaminiert sein und unerwartete bzw. unerwünschte Komponenten in die Präparation einschleppen. Außerdem ist oftmals ein passender Trichter nicht immer verfügbar.

3. Trennung durch Druckfiltration durch eine poröse Matrix

[00101] Die Trennung der Lysatkomponenten erfolgt durch Filtration. Ein solches Verfahren ist beispielsweise in der WO 93/11218 beschrieben. Hierbei wird das Lysat nach Mischen mit dem Neutralisationspuffer in eine am Auslaß verschlossene Spritze geeigneter Größe eingefüllt, die im Bodenbereich eine durch zwei Fritten eingeschlossene Adsorbentschicht aufweist. Nach einer 10 Minuten langen Inkubation, bei der sich der flockulente Niederschlag zum größten Teil an der Oberfläche der Flüssigkeit sammelt, wird das Lysat mittels eines geeigneten Stempels durch die Adsorbentschicht gedrückt. Die festen Bestandteile werden auf der Filterschicht zurückgehalten, während das ethalene Filtrat klar ist.

[00111] Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass weitere Kunststoffkomponenten erforderlich sind. Dadurch ist ein größerer Verpackungsaufwand notwendig und es fällt naturgemäß mehr Abfall an. Spritzenfilter sind sehr empfindlich gegenüber Überladung und verstopfen leicht. Daher muss der Anwender seine Kulturen sehr genau einstellen (Ermittlung der Zellzahl), um Überladungen zu vermeiden. Bei Überladungen können Teile von Zelltrümmern durch die Filterschicht hindurchgedrückt werden. Durch die Filtrationschicht geht immer ein gewisser Anteil an Lysat verloren.

[00121] Die in bekannter Weise hergestellten klaren Lysate werden dann nach üblichen Verfahren weiter aufgereinigt und schließlich chromatographiert, um die Nukleinsäuren aufzutrennen, d. h. von anderen Bestandteilen, wie RNA, zu trennen.

[00131] Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem die Nukleinsäuren aus dem Zellschat schnell und kostengünstig isoliert werden können, ohne dass eine aufwendige apparative Vorrichtung, wie beispielsweise eine Zentrifuge, notwendig ist. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, mit der auf einfache, schnelle und kostengünstige Weise Nukleinsäuren aus Zellen isoliert werden können.

[00141] Diese Aufgaben werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und der erfindungsgemäßen Trennvorrichtung gelöst.

[00151] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren von anderen Zellbestandteilen durch Lyse der Zellen und Fällung der Lysatkomponenten, wobei die Nukleinsäuren in Lösung bleiben, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Lysat in einer Trennvorrichtung durch ein Filtermaterial filtriert wird, das die Innenfläche der Trennvorrichtung zumindest fast vollständig bedeckt.

[00161] Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

[00171] Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Trennvorrichtung, die folgendes aufweist: eine Säule, eine Chromatogra-

phiematerial und ein in der Säule vorgesehenes Filtermaterial.

[0018] Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Trennvorrichtung.

[0019] Fig. 1 zeigt ein Beispiel für eine erfindungsgemäße Trennvorrichtung.

[0020] Das erfindungsgemäße Verfahren ist in der Praxis einfach und zeitsparend durchzuführen. Von besonderem Vorteil ist, dass das Filtermaterial in einer Trennvorrichtung integriert ist. Auf diese Weise erübrigt sich die Notwendigkeit einer Zentrifuge oder eines Trichters für die Aufnahme und Filtration des ungeklärten Lysats.

[0021] Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Trennvorrichtung kann praktisch jede Vorrichtung sein, die zur Trennung biologischer Bestandteile geeignet ist. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine zylindrische Vorrichtung in Form einer Trennsäule verwendet.

[0022] Erfindungsgemäß bedeckt das Filtermaterial zumindest fast vollständig die Innenfläche der in diesem Verfahren verwendeten Trennvorrichtung bzw. der Trennsäule. Es ist wesentlich, dass möglichst viel Filterfläche vorhanden ist, da eine Filterwirkung auch zu den Seiten erfolgt.

[0023] Es ist bevorzugt, dass die gesamte Innenfläche der Trennvorrichtung bzw. -säule mit dem Filtermaterial bedeckt ist. Dazu wird günstigerweise das Filtermaterial eng an die Wandungen und am Boden der Trennsäule angelegt.

[0024] Im Prinzip kann jedes Filtermaterial in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, das in der Lage ist, die ausgefallenen Lysatkomponenten zurückzuhalten, und, vor allem, nur einen geringen Verlust an Lysat gewährleistet. Als bevorzugtes Filtermaterial hat sich Filterpapier erwiesen. Als Beispiel kann hier ein handelsübliches Filterpapier für den Laborbedarf genannt werden, wie beispielsweise das Produkt Whatman Grade 5.

[0025] Erfindungsgemäß werden die Zellbestandteile, wie Zellrümpfer, Proteine, etc. in den Kopf der Trennvorrichtung eingegeben und am Filtermaterial adsorbiert. Das klare, die Nukleinsäure enthaltende Lysat fließt durch das Filterpapier zum Boden der Trennvorrichtung.

[0026] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens fließt das klare, die Nukleinsäuren enthaltende Lysat am Boden der Trennvorrichtung auf ein Chromatographiematerial. Auf diese Weise kann das klare Lysat chromatographiert werden, d. h. dass praktisch gleichzeitig mit der Abtrennung der Nukleinsäuren von den übrigen Zellbestandteilen die Nukleinsäuren, die in der Regel als Gemisch vorliegen, effektiv aufgetrennt werden können. Das bringt im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren eine beträchtliche Zeitersparnis, da der Zentrifugenschritt oder die Filtration zur Bildung eines isolierten klaren Lysats entfällt.

[0027] Das Chromatographiematerial, das in der Trennvorrichtung vorgesehen sein kann, ist normalerweise ein Trägermaterial, das mit Ionenaustauschergруппen modifiziert ist. Als Trägermaterial kann ein Kieselgel, wie es beispielsweise in der EP 0 744 025 beschrieben ist, verwendet werden. Des Weiteren ist auch ein Mikrogelglasfasermaterial, das in der DE-OS 199 62 577 beschrieben ist, als Träger geeignet.

[0028] Der Träger kann mit einem Silanisierungsreagenz umgesetzt sein. Als Silanisierungsreagenz kann beispielsweise ein solches verwendet werden, das in der WO 91/05606 beschrieben ist. Ebenfalls können nach bekannten Verfahren an der stationären Phase Anionenaustauschergруппen oder Kationenaustauschergруппen angebracht werden. Ein Beispiel dafür ist in der obigen WO-Schrift beschrieben.

[0029] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich praktisch alle Nukleinsäuren aus biologischen Zellen durch Abtrennung der anderen Zellbestandteile isolieren. In einer besonderen Ausführungsform wird das klare, die Nukleinsäuren enthaltende Lysat direkt in der Trennvorrichtung auf einem entsprechend modifizierten Trägermaterial chromatographiert, so dass eine Trennung von Nukleinsäuregemischen in DNA und RNA vorgenommen werden kann, wobei gleichzeitig die Nukleinsäuregemische hervorragend aufgelöst und in höchster Reinheit isoliert werden können.

[0030] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann jedes Nukleinsäuregemisch isoliert und ggf. getrennt werden. Beispiele für abzutrennende DNAs sind Phagemid-DNA, Phagen-DNA, Cosmid-DNA, genomische DNA, fragmentierte DNA, tRNA, mRNA, hnRNA, sn-RNA, Virus-DNA oder Viroid-DNA. In einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren ausgezeichnet beispielsweise zur Trennung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen, beispielsweise aus E. coli.

[0031] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls eine Trennvorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Verfügung, bei dem isoliert und aufgetrennt wird. In Fig. 1 ist ein Beispiel für eine solche Trennvorrichtung gezeigt. Die wesentlichen Bestandteile dieser Vorrichtung sind eine Säule 1, die eine handelsübliche Kunststoffsäule sein kann, ein Chromatographiematerial 3 und ein in der Säule vorgesehenes Filtermaterial 5. Die Säule weist einen nach unten verjüngenden Ausgang in Form einer Spitze zum Anlegen eines Vakuums auf. Vor dem Ausgang ist eine Unterfritte 2 vorgesehen, die mit dem Ausgang abschließt. Darauf ist das Chromatographiematerial aufgebracht. Zum Abschluss ist darauf eine Oberfritte 4 vorgesehen. Eine derartige Kunststoffsäule ist beispielsweise in der DE-OS 199 62 577 näher beschrieben. Unter Umständen wird noch ein Ring zur Fixierung der Oberfritte 4 über dieser vorgesehen (nicht gezeigt).

[0032] Das Filtermaterial kann jedes Material sein, das zum Abfiltrieren der ausgefallenen Zellbestandteile geeignet ist. Bevorzugt ist das Filtermaterial ein Papierfilter, der in der Weise ausgestaltet ist, dass er eng an der Wandung und am Boden der Trennvorrichtung anliegt.

[0033] Geeigneterweise ist der Papierfilter gefaltet. Beispielsweise lässt sich ein derartiger Papierfilter herstellen, indem ausgehend von einem rechteckigen Stück Filterpapier ein am Boden verschlossener zylindrischer Körper gefaltet wird, der exakt in eine Trennsäule hineinpasst. Damit ist der Filter in die Säule einsetzbar und auch nach Gebrauch wieder aus dieser herausnehmbar. Das hat insbesondere den Vorteil, dass nach der Passage des Lysats der Filter einfach aus der Säule herausgezogen werden und im normalen Bioabfall entsorgt werden kann. Somit fallen keine zusätzlichen Plastikkomponenten und kein zusätzliches Verpackungsmaterial an.

[0034] Durch die Wahl eines geeigneten Filterpapiers, wie beispielsweise Whatman Grade 5 ist die Durchlaufzeit des Lysats durch die Säule mit integriertem Filter praktisch identisch mit der Durchlaufzeit eines durch Zentrifugation geklärten Lysats durch die filterlose Säule. Wenn das Lysat im Vakuum abgezogen werden soll, was nach der Säule gemäß Fig. 1 durch Anlegen an der Spitze am Auslaß ohne Weiteres möglich ist, können sehr feinporeige Materialien verwendet werden, ohne die Geschwindigkeit herabzusetzen. Es hat sich herausgestellt, dass gerade durch die Saugwirkung und den direkten Transfer des Lysats auf das Chromatographiematerial schnellere Prozesszeiten und eine bessere Handhabbarkeit erzielt wird.

[0035] Wie bereits oben ausgeführt wurde, kann die erfin-

dungsgemäße Trennvorrichtung 1 ein Chromatographiematerial 3 am Boden der Säule aufweisen. Das Chromatographiematerial unterliegt keinen besonderen Beschränkungen, mit der Maßgabe, dass es dafür geeignet ist, Nukleinsäuremischungen aufzutrennen. Beispielsweise kann das Chromatographiematerial ein Kieselgel sein, das in der EP 0 744 025 beschrieben ist. Alternativ kann auch ein Mikrofaserematerial, wie es aus der DE-OS 199 62 577 bekannt ist, verwendet werden. Das Chromatographiematerial ist jeweils mit beispielsweise Ionenaustauschergруппen modifiziert, die ihrerseits kationisch oder anionisch sein können.

Dazu wird auf die vorherigen Ausführungen verwiesen. **[0036]** Mit der Trennvorrichtung können praktisch alle Nukleinsäuregemische von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt werden und gleichzeitig mit ausgezeichneter Auflösung und Reinheit erhalten werden. Hinsichtlich der Gemische wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen. Die Trennvorrichtung ist beispielsweise hervorragend geeignet, um Plasmid-DNA aus Bakterienzellen, wie beispielsweise *E. coli* zu präparieren.

[0037] Die erfindungsgemäße Trennvorrichtung lässt sich in vorteilhafter Weise als Kit zusammen mit den für die Chromatographie benötigten Puffern und ggf. anderen Komponenten anbieten. Der Anwender kann somit praktisch in einem Schritt die Lyسابestandteile von den Nukleinsäuren isolieren und die Nukleinsäuren in der gebotenen Reinheit und Auftrennung auftrennen und isolieren.

[0038] Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiele

Beispiel 1

Anzucht der Bakterienkulturen

[0039] Für die Plasmidpräparationen werden *E. coli*-Kulturen entsprechend gängiger mikrobiologischer Praxis angezo-gen. Am Tag 1 erfolgt ein Vereinzelausschuss aus einer tiegefrorenen Stock-Kultur auf einem selektiven Medium (z. B. LB-Agar mit Ampicillin als Antibiotikum). Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C auf dem Schüttler wird am Tag 2 eine gutgewachsene Einzelkolonie auf 50–300 ml Flüssigmedium (z. B. LB), dem das entsprechende Antibiotikum zugesetzt worden ist, inokuliert. Nach einer weiteren Übernachtinkubation bei 37°C auf dem Schüttler bei guter Belüftung (200–300 rpm) wird ggf. auf noch größere Kulturvolumina aufgestockt oder die gewachsene Kultur wird direkt abgeerntet. Im Falle des Aufstockens wird die entsprechende mit Antibiotikum versetzte Menge an frischem Flüssigmedium mit 1% ihres Volumens mit der Kultur des Vortages inokuliert und für eine weitere Übernachtinkubation bei 37°C auf dem Schüttler bei 200–300 rpm inkubiert.

[0040] Für eine Minipräparation werden 1–3 ml Menge Kultur mit High-Copy-Plasmid oder 5–20 ml Menge Kultur mit Low-Copy-Plasmid verwendet. Bei Midi- bzw. Maxi-präparationen werden entsprechend größere Mengen verwendet.

Beispiel 2

Isolierung der DNA aus den Bakterien

[0041] Die in Beispiel 1 angegebene Menge Bakterienkultur für eine Minipräparation wird in einem geeigneten Zentrifugationsgefäß für 3 Minuten bei 13.000 × g abzentrifugiert und das überstehende Medium wird komplett verwor-

fen. Eventuell vom Rand des Zentrifugationsgefäßes zurücklaufendes Medium wird mit der Pipette entfernt und ebenfalls verworfen.

[0042] Die pelletierten Bakterien werden durch Vortexen in 0,40 ml Puffer aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)/10 mM EDTA/100 µg/ml RNase vollständig resuspendiert. Es dürfen keine Zellklumpen oder –aggregate mehr zu erkennen sein.

[0043] Die suspendierten Zellen werden durch Zugabe von 0,4 ml Puffer aus 200 mM NaOH/1,0% (w/v) SDS ly-siert. Die suspendierten Zellen werden mit dem Lysepuffer durch mehrmaliges Invertieren gemischt bis eine homogene Phase entstanden ist. Diese Phase ist durch die ausgetrennte genomische Bakterien-DNA sehr viskos. Es wird für maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

[0044] Das Lysegemisch wird durch Zugabe von 0,4 ml Puffer aus 3,1–3,4 M Kaliumacetat (pH 5,5 mit Essigsäure) neutralisiert. Nach Zugabe des Puffers wird wiederum durch mehrmaliges Invertieren gemischt bis eine homogene Phase entstanden ist. Diese Phase ist jetzt wieder dünnflüssig. Es dürfen keine viskosen Reste des Zyklisates mehr vorhanden sein.

Beispiel 3

Trennung der Bakterien-DNA

[0045] Eine Säule mit Anionenaustauscher ("Jelstar" von GIB-NOMED), die integriert einen Papierfilter (Whatman Grade 5) aufweist, wird mit dem neutralisierten Lysegemisch aus Beispiel 2 beladen und dieses durch das Anlegen eines Wasserstahl-Vakuum durch die Säule vollständig durchgezogen. Die Vakuumpumpe bleibt hierbei so lange eingeschaltet, bis erkennbar keine Flüssigkeit mehr von der Säule abgesaugt wird. Danach wird das Vakuum abgeschaltet und der Filter mit den Zellbestandteilen verworfen. Für die Entfernung unspezifisch gebundener Komponenten wird die Säule mit Puffer aus 100 mM NaAc/HiAc (pH 5,0)/800 mM NaCl gewaschen. Dazu wird der Puffer in die Säule pipettiert und durch das Anlegen eines Wasserstahl-Vakuum durch die Säule vollständig durchgezogen. Die Vakuumpumpe bleibt so-lange eingeschaltet bis erkennbar keine Flüssigkeit mehr von der Matrix abgesaugt wird. Danach wird das Vakuum abgeschaltet.

[0046] Die Säule wird von der Vakuumkammer abgelöst und die an die Membran gebundene Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,8 ml Puffer 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)/1250 mM NaCl direkt in ein geeignetes Gefäß eluiert. Dazu wird der Puffer in die Säule pipettiert und mit Hilfe eines passenden Stempels durch die Säule manuell gedrückt. Hierbei sollte der Elutionspuffer in einer raschen Tropfenfolge, aber keinesfalls als Strahl durchgedrückt werden. Die einzelnen Tropfen müssen mit dem blossen Auge noch zu erkennen sein.

[0047] Die Eluate werden mit 0,7 Vol. Isopropanol (Raumtemperatur) versetzt und gut gemischt. Die so präzipitierte Plasmid-DNA wird für mindestens 30 Minuten bei $\geq 13.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die pelletierte DNA wird einmal mit 80%igem Ethanol gewaschen, wieder abzentrifugiert, anschließend getrocknet (entweder durch Stehenlassen bei Raumtemperatur oder im Vakuum), und die getrocknete DNA wird schließlich in einer geeigneten Menge TE-Puffer oder Wasser für 10 Minuten bei 37°C gelöst.

[0048] Die gelöste Plasmid-DNA wird spektrophotometrisch vermessen und auf einem Agarosegel analysiert.

[0049] Man erhält die Plasmid-DNA in einer deutlichen Bande ohne Verunreinigung mit RNA.

Patentsprüche

1. Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren von an-
deren Zellbestandteilen durch Lyse der Zellen und Fäl-
lung der Lysatkomponenten, wobei die Nukleinsäuren
in Lösung bleiben, **dadurch gekennzeichnet**, dass das
Lysat in einer Trennvorrichtung durch ein Filterma-
terial filtriert wird, das die Innenfläche der Trennvorrich-
tung zumindest fast vollständig bedeckt. 5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
net, dass die Trennvorrichtung eine Trennsäule ist. 10
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeich-
net, dass das Filtermaterial eng an die Wandungen und
am Boden der Trennsäule angelegt wird. 15
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1
bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Filtermaterial
ein Filterpapier verwendet wird. 20
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1
bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellbestand-
teile am Filtermaterial adsorbiert werden und das klare,
die Nukleinsäuren enthaltende Lysat durch das Filter-
papier zum Boden der Trennvorrichtung fließt. 25
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeich-
net, dass das klare, die Nukleinsäuren enthaltende Ly-
sat am Boden der Trennvorrichtung auf ein Chromato-
graphiematerial fließt. 30
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeich-
net, dass als Chromatographiematerial ein Trägermate-
rial verwendet wird, das mit Ionenaustauschergruppen
modifiziert ist. 35
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeich-
net, dass das Trägermaterial ein Kieselgel oder ein Mi-
kroglaskasermaterial ist. 40
9. Verfahren nach mindestens einem der vorangehan-
genen Ansprüche zur Isolierung von Plasmid-DNA aus
Bakterienzellen. 45
10. Trennvorrichtung zur Durchführung des Verfah-
rens nach mindestens einem der vorangegangenen An-
sprüche, die aufweist:
eine Säule (1), 40
ein Chromatographiematerial (3) und
ein in der Säule vorgesehenes Filtermaterial (5). 45
11. Trennvorrichtung nach Anspruch 10, dadurch ge-
kennzeichnet, dass die Säule (1) eine Kunststoffsäule
ist. 45
12. Trennvorrichtung nach Anspruch 11, dadurch ge-
kennzeichnet, dass die Säule (1) nach unten verjüngt ist
und einen Auslass in Form einer Spitze aufweist. 50
13. Trennvorrichtung nach mindestens einem der An-
sprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das
Chromatographiematerial (3) am Boden der Säule vor-
gesehen ist. 50
14. Trennsäule nach Anspruch 13, dadurch gekenn-
zeichnet, dass das Chromatographiematerial (3) ein
Kieselgel oder ein Mikroglaskasermaterial ist, das je-
weils mit Ionenaustauschergruppen modifiziert ist. 55
15. Trennvorrichtung nach mindestens einem der An-
sprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das
Filtermaterial (5) ein Papierfilter ist, der in der Weise
ausgestaltet ist, dass er eng an der Wandung und am
Boden der Säule (1) anliegt und die Innenfläche zumin-
dest fast vollständig bedeckt. 60
16. Trennvorrichtung nach Anspruch 15, dadurch ge-
kennzeichnet, dass der Papierfilter gefaltet ist. 65
17. Trennvorrichtung nach Anspruch 16, dadurch ge-
kennzeichnet, dass der Filter (5) in die Säule (1) ein-
setzbar und aus dieser herausnehmbar ist. 65
18. Trennvorrichtung nach mindestens einem der An-

sprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass wei-
terhin sie eine Oberfritte (4) und eine Unterfritte (2)
aufweist. 19. Trennvorrichtung nach mindestens einem der An-
sprüche 10 bis 18 zur Trennung von Plasmid-DNA aus
Bakterienzellen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Nummer:
Int. Cl. 7:
Offenlegungstag:

DE 102 01 858 A1
C 07 H 21/00
14. August 2003

Fig. 1

